

诊断引物应用于我国三种重要赤眼蜂分子鉴定的研究

耿金虎, 李正西, 沈佐锐*

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

摘要: 本研究根据螟黄赤眼蜂 rDNA-ITS2 序列设计了螟黄赤眼蜂 *Trichogramma chilonis* Ishii 特异引物, 同时采用文献中发表的松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* Matsumura 和玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostrinae* Pang et Chen 的特异引物以及赤眼蜂属 *Trichogramma* 特异引物对赤眼蜂成虫和寄主卵样品进行了 PCR 特异扩增分析。结果表明, 采用上述特异引物可从单头蜂稳定地扩增出明显的目的 DNA 条带, 并且分子鉴定结果与形态学鉴定结果完全吻合。因此, 采用上述 3 对特异引物可以实现对我国 3 种重要赤眼蜂种, 即松毛虫赤眼蜂、螟黄赤眼蜂和玉米螟赤眼蜂的分子鉴定。

关键词: 松毛虫赤眼蜂; 螟黄赤眼蜂; 玉米螟赤眼蜂; 诊断引物; 分子鉴定; rDNA-ITS2

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)05-0639-06

Application of species-specific primers to molecular identification of three important *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in China

GENG Jin-Hu, LI Zheng-Xi, SHEN Zuo-Rui* (Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Species-specific primers of *Trichogramma chilonis* Ishii has been designed based on its rDNA-ITS2 sequence in this paper, and the specific primers of *T. dendrolimi* Matsumura, *T. ostrinae* Pang et Chen and the genus *Trichogramma* were retrieved from previously published articles. All of the specific primers were then applied to identification of multiple *Trichogramma* and host eggs samples through PCR assays. The results showed that our methods could produce clear, unique and reproducible target DNA bands from individual adult wasp. Furthermore, the species-specific primer-based results were fully consistent with those derived from morphology-based ones. Thus, the molecular identification of the three important *Trichogramma* species in China, namely *T. dendrolimi*, *T. chilonis* and *T. ostrinae*, using the above-described diagnostic primers was proved feasible.

Key words: *Trichogramma dendrolimi*; *T. chilonis*; *T. Ostrinae*; diagnostic primers; molecular identification; rDNA-ITS2

赤眼蜂 *Trichogramma* 是生物防治中广泛用来防治鳞翅目害虫的一类重要天敌昆虫(Li, 1994)。目前, 我国成为世界上应用赤眼蜂最多的国家之一, 松毛虫赤眼蜂 *T. dendrolimi*、螟黄赤眼蜂 *T. chilonis* 及玉米螟赤眼蜂 *T. ostrinae* 是主要研究和应用的蜂种(刘树生和施祖华, 1996)。不同赤眼蜂种和种下型其行为学和生物学特点存在差异, 不同地理区域和不同的害虫往往需要释放相应的蜂种和种下型进行生物防治。赤眼蜂种类的正确鉴定是开展其研究与应用的首要前提。在室内大量繁殖赤眼蜂的过程中, 为维持蜂种的品质常需将采自野外靶标害虫的赤眼蜂加入到饲养种群中, 此时极易造成不同蜂

种的混杂(Chang et al., 2001.)。此外, 室内保种过程中, 也存在着不同蜂种混杂的可能性。赤眼蜂淹没释放目前已成为国内外鳞翅目农林害虫综合治理的重要手段。赤眼蜂散放后将被“淹没”在当地的生物群落之中, 若要评价该赤眼蜂的生防效力, 定期抽样和鉴定工作是必需的, 对于应用者来说, 他们也希望在田间防效调查工作中能够确认种类, 进而确定所采用的此项生防措施的有效性。然而, 赤眼蜂个体微小, 体长多在 0.5 mm 以下, 缺乏足够的形态学特征(Pinto and Stouthamer, 1994)。赤眼蜂的鉴定一直非常困难, 传统形态分类往往以雄外生殖器作为最主要的形态特征, 不但耗时耗力, 且难以鉴定雌蜂

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370961)

作者简介: 耿金虎, 1977 年 6 月生, 博士研究生, 研究方向为昆虫分子生态学, E-mail: gengjh@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: ipmist@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2004-04-23; 接受日期 Accepted: 2004-07-13

和幼期虫态。利用这样的传统方法进行赤眼蜂种类鉴定只有为数不多的分类专家才能胜任。

近年来基于 DNA 分析的分子标记技术的应用为上述问题的解决提供了新的途径。用于赤眼蜂分子标记的技术方法主要有目的基因的 PCR-RFLP (Sappal *et al.*, 1995; Stouthamer *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999)、RAPD (Landry *et al.*, 1993)、设计特异引物来扩增目的基因 (Amomsak *et al.*, 1998) 以及目的基因的直接测序等, 设计蜂种特异引物采用 PCR 扩增是其中一种较为快捷、高效的分子鉴定方法。同时核糖体核糖核酸基因 (rDNA) 也作为重要分子靶标用于比较近缘种间的系统发生关系。核糖体核糖核酸基因 (rDNA) 在所有生物中广泛存在, 包含几个区段 (基因和间隔区), 其中不同的区段进化速率不同, 因此可分别用来对不同分类阶元作系统进化研究。第二内部转录间隔区 (ITS2) 被广泛用于物种分

类地位的检验和物种鉴定 (Pinto and Stouthamer, 1997)。本文根据螟黄赤眼蜂 rDNA-ITS2 序列设计了螟黄赤眼蜂特异引物, 同时采用文献中发表的松毛虫赤眼蜂诊断引物、玉米螟赤眼蜂特异引物以及赤眼蜂属特异引物对多个蜂种样品进行了 PCR 特异扩增分析, 以期确立准确快速鉴定我国生物防治中重要的 3 种赤眼蜂的分子鉴定体系, 为赤眼蜂的更有效利用提供有效工具。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及处理

本研究使用了 25 个赤眼蜂种 (品系) 和 4 种寄主卵样品, 其中 11 个蜂种 (品系) 样品及 4 种寄主卵样品材料编号、来源和采集地点列于表 1。待出蜂后, 将活虫单头装于 0.2 mL 消毒微量离心管中, 新

表 1 11 个蜂种 (品系) 和 4 种寄主卵材料及其来源和采集地点
Table 1 Identity and origin of samples of 11 *Trichogramma* species and populations and 4 host eggs

样品编号 Sample no.	赤眼蜂及寄主卵 Species	来源 Origin	采集地点 Localities
a	松毛虫赤眼蜂 <i>T. dendrolimi</i>	北京农林科学院 Beijing Academy of Agriculture and Forestry	吉林 Jilin
b	松毛虫赤眼蜂 <i>T. dendrolimi</i>	广东省农科院植保所 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences	不祥 Unknown
c	螟黄赤眼蜂 <i>T. chilonis</i>	北京农林科学院 Beijing Academy of Agriculture and Forestry	不祥 Unknown
d	螟黄赤眼蜂 <i>T. chilonis</i>	广东省农科院植保所 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences	广东 Guangdong
e	螟黄赤眼蜂 <i>T. ostrinae</i>	广东省农科院植保所 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences	广东 Guangdong
f	玉米螟赤眼蜂 <i>T. ostrinae</i>	北京农林科学院 Beijing Academy of Agriculture and Forestry	北京昌平 Changping, Beijing
g	玉米螟赤眼蜂 <i>T. ostrinae</i>	河北省衡水市旱作农业研究所 Institute of Dryland Crop Research, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences	河北衡水 Hengshui, Hebei
h	广赤眼蜂 <i>T. evanescens</i>	北京农林科学院 Beijing Academy of Agriculture and Forestry	北京 Beijing
i	甘蓝夜蛾赤眼蜂 <i>T. brassicae</i>	德国农林生物研究中心生防所 Federal Biological Research Center for Agriculture and Forestry, Institute of Biological Control, German	不祥 Unknown
j	食胚赤眼蜂 <i>T. embryophagum</i>	德国农林生物研究中心生防所 Federal Biological Research Center for Agriculture and Forestry, Institute of Biological Control, German	不祥 Unknown
k	卷蛾赤眼蜂 <i>T. cacoeciae</i>	德国农林生物研究中心生防所 Federal Biological Research Center for Agriculture and Forestry, Institute of Biological Control, German	不祥 Unknown
l	米蛾 <i>Corcyra cephalonica</i>	中国农业大学养虫室 Insectary of China Agricultural University	北京 Beijing
m	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	中国农业大学养虫室 Insectary of China Agricultural University	河北 Hebei
n	亚洲玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	中国农业大学养虫室 Insectary of China Agricultural University	不祥 Unknown
o	甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i>	中国农业大学养虫室 Insectary of China Agricultural University	河北 Hebei

鲜冻存待用。寄主卵在产后 72 h 将单粒(块)卵装于 0.2 mL 消毒微量离心管中,新鲜冻存待用。另外 14 个蜂种(品系)样品为待检材料由吉林农业大学现代化农业研究所提供,室内采用柞蚕卵保种,其原始寄主、采集田块类型,采集地点和采集时间列于表 2。出蜂后,将样品用 80% 酒精保存待用。

1.2 单头蜂模板 DNA 制备方法及主要生化试剂

DNA 提取参照李正西和沈佐锐(2001, 2002)的方法。新鲜样品直接研磨,在放有单头蜂样品的 0.2 mL 微离心管中,加入 20 μ L 的 STE(0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris•HCL pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0),用组织研磨器将样品捣碎,加入蛋白酶 K

(20 mg/mL)0.5 μ L,研磨液置 56℃ 水浴 1 h,消化后的产物置于沸水中 1 min,3 000 r/min 离心 30 s 沉淀残渣,上清液作为 PCR 的模板或 - 20℃ 保存待用。对于酒精浸泡样品,先从中吸取单头置于滤纸上吸去酒精,用枪头挑入 0.2 mL 微离心管中,加入 100 μ L TE 浸泡 1 h,接下来步骤同上。Taq 酶为 MBI 公司产品,dNTP 混合液为 Geneview 公司产品;蛋白酶 K 为大连宝生物工程公司产品;引物由上海生物工程公司合成。

1.3 引物

本研究中使用的蜂种诊断引物名称、序列、产物大小、退火温度(T_m)及文献出处列于表 3。

表 2 14 个待测蜂种(品系)的原始寄主、采集田块类型,采集地点和采集时间
Table 2 Original hosts, collection localities and date of samples of 14 *Trichogramma* spp. and populations to be detected

样品编号 Sample no.	原始寄主 Original hosts	采集田块类型 Fields	采集地点 Localities	采集时间 Collection date
1	挂卡诱集 Hanging egg	果园 Orchard	吉林省长春市 Changchun, Jilin	不祥 Unknown
2	亚洲玉米螟 <i>Ostrinia fumacalis</i>	玉米田 Maize field	黑龙江省十二部 Shierbu, Heilongjiang	2003
3	挂卡诱集 Hanging egg	菜田 Garden field	吉林省长春市 Changchun, Jilin	1998
4	亚洲玉米螟 <i>Ostrinia fumacalis</i>	玉米田 Maize field	黑龙江 Heilongjiang	2000
5	挂卡诱集 Hanging egg	水稻田 Paddy field	吉林省长春市 Changchun, Jilin	不祥 Unknown
6	亚洲玉米螟 <i>Ostrinia fumacalis</i>	玉米田 Maize field	黑龙江苇河 Weihe, Heilongjiang	2003
7	挂卡诱集 Hanging egg	大豆田 Soybean field	吉林省长春市 Changchun, Jilin	1999
8	挂卡诱集 Hanging egg	果园 Orchard field	吉林省长春市 Changchun, Jilin	1998
9	不祥 Unknown	不祥 Unknown	新疆 Xinjiang	不祥 Unknown
10	亚洲玉米螟 <i>Ostrinia fumacalis</i>	玉米田 Maize field	黑龙江土头沟 Tutougou, Heilongjiang	2000
11	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	棉田 cotton field	山东 Shandong	不祥 Unknown
12	不祥 Unknown	甘蔗田 Sugarcane field	湖南 Hunan	不祥 Unknown
13	不祥 Unknown	不祥 Unknown	江苏徐州 Xuzhou, Jiangsu	不祥 Unknown
14	亚洲玉米螟 <i>Ostrinia fumacalis</i>	玉米田 Maize field	黑龙江亚布力 Yabuli, Heilongjiang	2002

1.4 PCR 扩增及电泳

PCR 总反应体系 25 μ L: 17 μ L 超纯水,2.5 μ L 10 $\times$ Buffer, 2.5 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$, 0.4 μ L 10 mmol/L dNTP 混合液, 25 μ mol/L 正反引物各 0.3 μ L, 1 μ L 模板 DNA, 1 μ L Taq 酶(1 U/ μ L)。PCR 循环程序为: 95℃ 变性 3 min, 接着 32 个循环: 94℃ 变性 45 s、 T_m

(T_m 值参考表 3)退火 45 s、72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 延伸 10 min, 置 4℃ 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖(Spain)凝胶电泳分离、100 bp DNA Ladder 分子量标准参照物, 溴化乙锭(EB)染色、漂洗、脱色, 最后在紫外成像系统记录结果。

1.5 样品的 PCR 检测

将上述 11 个蜂种(品系)和 4 种寄主卵样品(表 1)单头蜂模板 DNA 分别用松毛虫赤眼蜂、螟黄赤眼蜂、玉米螟赤眼蜂和赤眼蜂属的诊断引物对,即 Td596f/Td596r(320 bp)、TrichF/TcR486(486 bp)、T/O

(458 bp)和 TdL1/ITSB(500 bp 左右)来检测,其中 TdL1/ITSB 用来验证单蜂模板 DNA 提取的有效性。对于 14 个用柞蚕卵保种的待检蜂种(品系)样品(表 2),由于玉米螟赤眼蜂一般不寄生大卵,故未用 T/O (458 bp)检测,其他同上。

表 3 诊断引物序列和目标扩增产物大小

Table 3 Species-specific primers sequence and the expected DNA band size to be amplified

赤眼蜂种 Species	引物名称 Primers	引物序列 (5'→3') Sequences	产物大小(bp) Expected size (bp)	Tm (℃)	引物来源 Sources
<i>T. chilonis</i>	TrichF	TTCTCGCATCGATGAAGAACG	486	54	自行设计 Designed
	TcR486	GCTGCTGTGTTGATACAACC			
<i>T. dendrolimi</i>	Td596f	GCAGCAGTCAAGACGACA	320	54	Li and Shen, 2002b
	Td596r	TTA AATTCAGCGGGTGGT			
<i>T. ostriniae</i>	T	AACAAGCACCGACGTGTTATC	458	59	Chang <i>et al.</i> , 2001
	O	TCGCAGCACACACGCACGTA			
<i>T. spp.</i>	TdL1	CTGGCTGAGGGTCGTTTA	~ 500	54	Li and Shen, 2001b
	ITSB	TCCTCGCGTTATTGATATGC			

2 结果和分析

2.1 PCR 特异扩增检测不同赤眼蜂种

引物 Td596f/Td596r、TrichF/TcR486 和 T/O 对所测试的 11 个赤眼蜂种(品系)(表 1),从单头松毛虫赤眼蜂、螟黄赤眼蜂和玉米螟赤眼蜂分别可稳定扩增出明显的特异性 DNA 片段,PCR 产物分别为 320 bp、486 bp 和 458 bp,对照样品无扩增产物。引物 TdL1/ITSB 从所测试的所有赤眼蜂样品中扩增出 500 bp 左右的 DNA 片段,表明从各赤眼蜂样品中提取的 DNA 模板是可用的。

2.2 待检样品的分子鉴定

应用特异引物 Td596f/Td596r、TrichF/TcR486 和 TdL1/ITSB 对 14 个酒精浸泡样品的检测结果(图 1)显示,引物 TdL1/ITSB 从测试的所有赤眼蜂扩增出 500 bp 左右的 DNA 片段,表明从各赤眼蜂样品中提取的 DNA 模板是可用的。14 个样品分子检测结果均为松毛虫赤眼蜂或螟黄赤眼蜂,并与形态分类鉴定结果相吻合。

3 讨论

赤眼蜂种特异引物是通过定位赤眼蜂 ITS2 序列的“种保守区域”设计的,而赤眼蜂种的分子鉴定可利用确证的蜂种诊断引物并通过 PCR 特异扩增来实现(李正西和沈佐锐,2002a)。若要获得可靠的

蜂种诊断引物,从理论上讲,有必要测定该蜂种所有地理种群(品系)ITS2 序列,并进一步定位“种保守区域”。但由于资源、时间和财力的限制,往往难以收集到所有的样本用于测序和分析。本研究中松毛虫赤眼蜂诊断引物 Td596f/Td596r(320 bp)和螟黄赤眼蜂诊断引物 TrichF/TcR486(486 bp)通过对供试的 26 个赤眼蜂样品和 4 种寄主卵样品单头蜂或单粒(块)寄主卵的检测和验证,玉米螟赤眼蜂诊断引物 T/O (458 bp)通过对 11 个赤眼蜂样品(包含 3 个玉米螟赤眼蜂地理品系)和 4 种寄主卵样品单头蜂或单粒(块)寄主卵的检测,证明可从单头蜂或单粒(块)寄生卵稳定地扩增出明显的目的 DNA 条带,并且分子鉴定结果与形态学鉴定结果完全吻合。因此,从研究结果可以推定:采用上述 3 对特异引物可以实现对我国 3 种主要赤眼蜂种,即松毛虫赤眼蜂、螟黄赤眼蜂和玉米螟赤眼蜂的分子鉴定。

国内外学者关于赤眼蜂的分子鉴定问题,采用多种基于核糖体核糖核酸基因(rDNA)的分子技术已经进行了大量研究,对推动赤眼蜂研究应用和辅助传统形态分类鉴定起到了一定作用。普遍采用的技术有:随机扩增 DNA 多态性(RAPD-PCR),DNA 限制性长度多态性(PCR-RFLP)和物种特异诊断引物(species-specific PCR primers)分析。相比较而言,RAPD-PCR 技术任意引物的筛选较繁琐,而且 RAPD-PCR 本身存在操作的标准化和结果的可重复性问题,PCR-RFLP 需要大量筛选限制性内切酶,且要经过酶切消化过程,而设计物种特异诊断引物操

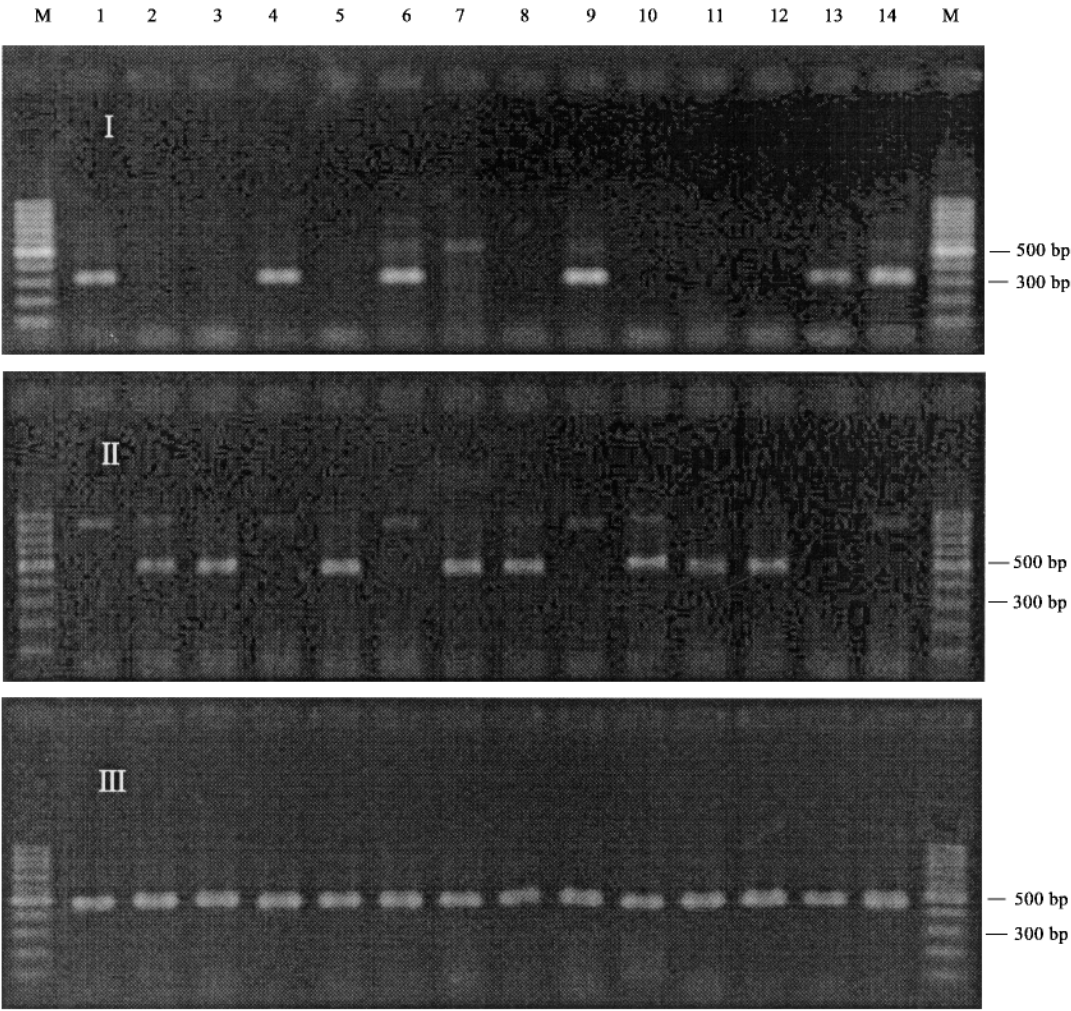


图 1 诊断引物 Td596f/Td596r(I)(320 bp)、TrichF/TcR486(II)(486 bp)和 TdL1/ITSB(III)(500 bp 左右)对 14 个待检样品的 PCR 扩增

Fig. 1 Diagnostic PCR assays of 14 *Trichogramma* samples using diagnostic primers, Td596f/Td596r for *T. dendrolimi* (I), TrichF/TcR486 for *T. chilonis* (II) and TdL1/ITSB for all *Trichogramma* spp.(III)

M: 100 bp DNA Ladder; 1 - 14: 代表 14 个待检赤眼蜂蜂种(品系)(表 2), 鉴定结果显示: 样品 1、4、6、9、13 和 14 是松毛虫赤眼蜂, 样品 2、3、5、7、8、10、11 和 12 是螟黄赤眼蜂 Representing 14 *Trichogramma* samples detected (Table 2), the results indicated that 1, 4, 6, 9, 13 and 14 are *T. dendrolimi*, while 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11 and 12 are *T. chilonis*.

作简单, 成本低, 可重复性好, 检测结果明了准确且更符合实际生产和研究需要。在操作过程中未得到阳性诊断 DNA 片段, 主要由两方面原因造成, 一是检测样品不是目标蜂种, 二是样品 DNA 降解。对于要求大量样本生态学研究而言, 由后者造成的检测误差是可以接受的。

基于蜂种诊断引物 PCR 扩增单头蜂模板 DNA 的检测技术对样品的取材方式要求灵活, 可以是鲜样、酒精保存样或干蜂样。不仅能鉴定雄蜂, 也能鉴定雌蜂, 还能鉴定未成熟虫态。本研究力求建立分子标记技术体系, 目的不是取代传统形态分类鉴定

方法, 而在于它在以下方面具有重要应用价值: (1) 赤眼蜂蜂种资源监测; (2) 赤眼蜂生防效力的精确评估; (3) 赤眼蜂共寄生、寄主识别和种间竞争行为研究; (4) 赤眼蜂工厂化生产中的质量监控; (5) 赤眼蜂田间优势种调查。

致谢 本研究承蒙北京市农林科学院生物防治科研中试基地王素琴、张帆, 吉林农业大学现代化农业研究所张俊杰, 河北衡水市旱作农业研究所宋凯, 中国农业科学院植物保护研究所王振营提供赤眼蜂虫源和样品, 福建农林大学林乃铨教授和华南农业大学何晓芳博士鉴定赤眼蜂样品, 特表谢忱!

参 考 文 献 (References)

- Amomsak W, Gordh G, Graham G, 1998. Detecting parasitised eggs with polymerase chain reaction and DNA sequence of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Australian Journal of Entomology*, 37: 180–182.
- Chang SC, Hu NT, Hsin CY, Sun CN, 2001. Characterization of differences between *Trichogramma* wasps by molecular markers. *Biol. Control*, 21: 75–78.
- Landry BS, Dextraze L, Boivin G, 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome*, 36: 580–587.
- Li LY, 1994. World-wide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey. In: Wajnberg E, Hassan SA eds. *Biological Control with Egg Parasitoids*. England: CAB International. 37–53.
- Li ZX, Shen ZR, 2001a. Application of molecular markers to molecular monitoring of *Trichogramma* spp. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 9(1): 65–68. [李正西, 沈佐锐, 2001a. 分子标记用于赤眼蜂分子监测的研究. 农业生物技术学报, 9(1): 65–68]
- Li ZX, Shen ZR, 2001b. rDNA-ITS2 sequencing and species-specific primer designing for *Trichogramma*. *Chinese J. Biol. Control*, 17(2): 75–80. [李正西, 沈佐锐, 2001b. 赤眼蜂 rDNA-ITS2 克隆测序及蜂种特异引物设计. 中国生物防治, 17(2): 75–80]
- Li ZX, Shen ZR, 2002a. Application of rDNA-ITS2 sequences to the molecular identification of *Trichogramma* spp. *Acta Entomol. Sin.*, 45(5): 559–566. [李正西, 沈佐锐, 2002a. 赤眼蜂分子鉴定技术研究. 昆虫学报, 45(5): 559–566]
- Li ZX, Shen ZR, 2002b. PCR-based technique for identification and detection of *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Entomologia Sinica*, 9(1): 9–16.
- Lin NQ, 1994. Systematic Studies of Chinese Trichogrammatidae. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House. [林乃铨, 1994. 中国赤眼蜂分类 (膜翅目: 小蜂总科). 福州: 福建科学技术出版社]
- Liu SS, Shi ZH, 1996. Recent developments in research and utilization of *Trichogramma* spp. *Chinese J. Biol. Control*, 12(2): 78–84. [刘树生, 施祖华, 1996. 赤眼蜂研究和应用的进展. 中国生物防治, 12(2): 78–84]
- Pinto JD, Stouthamer R, 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: Wajnberg E, Hassan SA eds. *Biological Control with Egg Parasitoids*. England: CAB International. 1–36.
- Pinto JD, Stouthamer R, Platner GR, 1997. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 99: 238–247.
- Sappal NP, Jeng RS, Hubbes M, Liu F, 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. *Genome*, 38: 419–425.
- Silva IMMS, Honda J, van Kan FJPM, Hu J, Neto L, Pintureau B, Stouthamer R, 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biol. Control*, 16: 177–184.
- Stouthamer R, Hu JG, van Kan FJPM, Platner GR, Pinto JD, 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *Biol. Control*, 43: 421–440.

(责任编辑: 袁德成)